AUS DER I. MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK DER CHARITÉ
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. WILHELM HIS)

Versuche über die Urform der basophilen Substanz in den Erythrocyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

eingereicht von

Hilde Daum

Tag der Promotion: 15. 12. 1934

1934
AKADEMISCHE VERLAGSGESELLSCHAFT M. B. H.
LEIPZIG

85

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Gocht

Referent: Prof. Dr. Viktor Schilling

Korreferent: Prof. Dr. v. Bergmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Diese Arbeit erschien gleichzeitig in „Folia Haematologica", 53. Band, Heft 1

Druck der Offizin Poeschel & Trepte in Leipzig

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik der Charité.
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Wilhelm His.)

Versuche über die Urform der basophilen Substanz in den Erythrocyten.

Von

Hilde Daum.

Ehrlich war es, der zum ersten Male, im Jahre 1885, bei anämischen Zuständen im Blut Erythrocyten fand, die sich dadurch von den orthochromatischen unterschieden, daß sie eine Affinität zu basischen Farbstoffen besaßen, gegen die sich gewöhnliche Erythrocyten refraktär verhalten. 1893 beschreibt dann Askanazy bei perniziösen Anämien Körnchen, die sich mit basischen Farbstoffen färben, sowohl in Erythrocyten, Erythroblasten als auch in Normoblasten vorkommend. Während er anfangs glaubte, diese basophilen Körnchen mit intracellulärer Karyorhexis in Zusammenhang bringen zu dürfen, kommt er später zu der Ansicht, daß es sich um Veränderungen im Protoplasma handele. Bald darauf berichtet Behrendt von basophilen Punktierungen bei Bleivergiftungen. Plehn hält sie für Dauerformen der Malariaparasiten. Gerade nach seiner Arbeit wird das Interesse der verschiedenen Hämatologen für Erythrocyteneinschlüsse immer lebhafter, und es erscheinen in der Folgezeit eine Reihe von Arbeiten über diesen Gegenstand. So vertreten Grawitz und seine Schüler die Anschauung, daß die basophile Punktierung der Ausdruck einer Degeneration im Protoplasma sei; dazu veranlaßt wurden sie durch das Auftreten der Körnelung nach Bleivergiftung, und zwar nimmt Grawitz eine plasmotrope Wirkung der Gifte an, d. h. in der Zirkulation sind die roten Blutkörperchen intakt, das Gift hat nur eine deletäre Wirkung auf die Blutzellen in der Leber, Milz und im Knochenmark (im Gegensatz zur Plasmolysis, worunter eine Auflösung der Roten in der Zirkulation mit Hämoglobinämie zu verstehen ist). Gemeinsam den zahlreichen Arbeiten, die sich mit der basophilen Substanz in den Erythrocyten beschäftigen, sind immer wieder zwei Hauptfragen:

a) ist die basophile Substanz als ein Zeichen der Regeneration oder Degeneration zu werten,

b) gehört die basophile Substanz zum Kern oder zum Protoplasma, ist sie karyogener oder plasmogener Abkunft.

Während wir heute unter basophiler Substanz der Erythrocyten die drei Erscheinungsformen: die vitale Netzstruktur, Polychromasie und basophile Punktierung zusammenfassen, beschäftigen sich die älteren Forscher in der Hauptsache mit der Polychromasie und basophilen Punktierung; den Italienern, vor allem CESARIS-DEMEL, gebührt das Verdienst, besonders auf die vitale Netzstruktur aufmerksam gemacht zu haben. Die Beziehungen von Vitalstruktur, Polychromasie und basophiler Punktierung zueinander, ihre Wertung als Regenerations- oder Degenerationszeichen, ihre Herkunft vom Kern oder Protoplasma wurden in vielen Arbeiten diskutiert, alle nur möglichen Anschauungen vertreten, so daß eine stattliche Anzahl von Theorien entstand, von denen PAPPENHEIM sich die Mühe genommen, sie in einer Arbeit zusammenzustellen. Ein wesentlicher Fortschritt und Einigung in den Fragen um die basophile Substanz in den Erythrocyten wurden erst durch die umfassenden Arbeiten von V. SCHILLING erzielt, der unter Berücksichtigung früherer Forschungsergebnisse und eigener Versuche zu der Auffassung von der substantiellen Identität der vitalen Netzstruktur, Polychromasie und basophilen Punktierung und ihrer protoplasmatischen Abkunft kam. Der Grund dafür, daß nun ein und dieselbe Substanz in drei morphologisch verschiedenen Formen auftritt, ist heute noch nicht restlos geklärt; uns interessiert vor allem die Frage hier, wie ist die basophile Substanz in lebenden Erythrocyten im zirkulierenden Blut und an seiner Bildungsstätte verteilt, welches ist die Urform der basophilen Substanz. Zu diesem Zwecke wurden eine Reihe von Versuchen unternommen. Bevor ich aber auf deren Beschreibung eingehe, sei mir gestattet, einen kurzen Überblick über die drei Formen der basophilen Substanz (vitale Netzstruktur, Polychromasie, basophile Punktierung), ihre Beziehungen zueinander, ihre Natur und Bedeutung zu geben.

I. Die vital-granuläre Substanz,

auch vitale Netzstruktur, Substantia granulo-filamentosa oder Retikularsubstanz genannt, tritt auf bei Vitalfärbung des Blutes, besonders gut darstellbar durch Brillantkresylblaufärbung unter Benutzung der feuchten Kammer. Dabei erscheint die basophile Substanz in Form von feineren oder gröberen netzartigen Gebilden mit Körnchen und Fäden, die untereinander in Verbindung stehen; teils füllen sie die ganze Zelle aus, teils sind sie nur im Zentrum oder am Rande des Erythrocyten gelagert. Man findet vitalstrukturierte Erythrocyten im allgemeinen in geringem Grad auch im Blut von gesunden Erwachsenen, besonders reichlich aber dann, wenn auf den Organismus Faktoren einwirken, die einen Reiz auf die blutbildenden Organe ausüben und somit eine gesteigerte Erythropoese bedingen. So sieht man vermehrte Rote mit vitaler Netzstruktur auftreten nach allen möglichen Arten von Anämien, primärer, sekundärer, traumatischer und toxischer Anämie, oft gleich-

zeitig mit anderen Regenerationserscheinungen (Anisocytose, kernhaltige Rote), dagegen nicht bei aplastischer Anämie, besonders bei Bleivergiftung, nach Leukämie, nach Tumoren, Malaria, nach Röntgenbestrahlung mit Reizdosen (Radiologen), außerdem nach therapeutischen Maßnahmen wie Arsen- und Eisenbehandlung bei Chlorose. Nicht allein in Erythrocyten ist die Vitalstruktur zu finden, auch in Erythroblasten, Normoblasten, Megalocyten und Megaloblasten, im zirkulierenden Blut und im Knochenmark, physiologisch in hohem Prozentsatz bei Embryonen und Neugeborenen. Heute unterliegt es wohl keinem Zweifel mehr, daß die vitalgranuläre Substanz jugendlichen Ursprungs ist. Vermehrtes Auftreten gestattet auf verstärkte regeneratorische Knochenmarkstätigkeit zu schließen. Die Jugendlichkeit der Vitalstruktur wird nicht allein durch ihr Vorkommen in Erythroblasten, Megalocyten, im Knochenmark und bei Embryonen bewiesen, ein Symptom hierfür ist auch, wie neuere Forschungen ergeben haben, der vermehrte O_2-Verbrauch, der an die Retikulocyten (nicht an die kernhaltigen Elemente, wie WARBURG ursprünglich annahm) gebunden ist, und die erhöhte Resistenz im Vergleich zu den normalen Erythrocyten. Somit ist die Zahl und das Auftreten der Erythrocyten mit Vitalstruktur als ein feiner Indikator für die regenerative Knochenmarkstätigkeit zu werten. Bei der normalen Erythropoese verlassen die Erythrocyten ihre Bildungsstätte erst, wenn sie vollkommen ausgereift sind, d. h. sie haben dann schon ihre basophile Substanz eingebüßt, denn es ist anzunehmen, daß die „Substantia granulo-filamentosa einen konstanten Durchgangszustand, eine morphologische Entwicklungsform im normalen Reifungsvorgang aller hämoglobinhaltigen Zellen bei Mensch und Tier darstellt" (SEYFARTH). Diagnostisch ist somit das vermehrte Auftreten der Retikulocyten beim Erwachsenen von außerordentlicher Bedeutung und in der Praxis gut verwertbar, da ihr Erscheinen mit Hilfe der SCHILLINGschen Methode vom dicken Tropfen relativ einfach nachzuweisen ist. Vor allem gestattet das Auftreten der Retikulocyten eine „latente Blutmauserung" zu erkennen, wie das oft bei leichteren Blutungen, z. B. im Magen-Darm-Trakt (Ulcus), latente Malaria sehr wissenswert ist, besonders da, wo weder Blut im Stuhl ist, noch sonst ein Vorgang im Blut an der Erythrocytenzahl oder dem Hämoglobingehalt zu erkennen ist. Nicht allein die regenerative Bedeutung der vitalen Netzstruktur, sondern auch ihre protoplasmatische Abkunft ist wohl heute allgemein anerkannt, wird sie doch in Normoblasten, die sowohl in Mitose stehen, als auch in Erythroblasten mit ganz intaktem Kern angetroffen. Während ROSIN-BIEBERGEIL, CESARIS-DEMEL glaubten, daß die vital färbbare Substanz dieselbe Bedeutung habe wie die basophile Punktierung in fixiertem Präparat, vertreten SABRAZES, PAPPENHEIM, SCHILLING u. a. die Anschauung, daß die Substantia granulo-filamentosa der Polychromasie entspräche.

II. Polychromasie.

Unter Polychromasie ist die rein basische Färbbarkeit gewisser Erythrocyten zu verstehen. Polychromasie ist bei allen Zuständen, wie Anämien usw., wie sie bereits oben bei Vitalstruktur erwähnt sind, zu finden. Bei Giemsa- und Methylenblaufärbungen erscheinen polychromatische rote Blutkörperchen, mehr oder weniger intensiv blaugefärbt. Bei oberflächlicher Betrachtung scheint die Polychromasie diffus im ganzen Erythrocyten verteilt zu sein, bei stärkster Vergrößerung löst sie sich doch in feinste eng beieinanderliegende kleine Körnchen auf. Die Zahl der vitalstrukturierten Erythrocyten bei der Vitalfärbemethode entspricht nahezu der Zahl der Polychromaten im fixierten und gefärbten Ausstrich. Die Nachweisbarkeit der Polychromasie ist durchschnittlich etwas kleiner als die der vitalgefärbten Erythrocyten, was der Darstellungsmethode zur Last zu legen ist. Über die Identität der vitalgefärbten und polychromatischen Erythrocyten herrschte lange Meinungsverschiedenheit; vor allem waren es FERRATA und BOSELLI, die die Identität ablehnten, während HERTZ und SCHILLING u. a. bewiesen, daß die beiden Zellarten identisch sind, und daß die vitalgefärbten im fixierten Präparat als polychromatische erscheinen. Polychromasie ist nur in solchem Blut zu finden, in dem auch Vitalgranulierte nachgewiesen werden und umgekehrt; darauf weisen schon ROSIN und BIEBERGEIL hin, und beide Erscheinungsformen zeigen eine „reaktive Überfunktion des Knochenmarks" an. Man nimmt heute mit Recht an, daß sie nur verschiedene Färbeausdrücke ein und derselben Substanz sind. So neigen heute die meisten Hämatologen zu der Ansicht, daß die Vitalstruktur mit der echten Polychromasie substantiell identisch, morphologisch nur durch „Färbung, Sonderung und Fällung" modifiziert sei.

III. Die basophile Punktierung.

Auch die basophile Punktierung ist bei anämischen Zuständen zu finden, besonders bei Anaemia perniciosa und Bleivergiftungen. Im gewöhnlichen Ausstrich-Präparat mit Methylenblau und Giemsa imponiert sie als feine, mittelgrobe oder grobe blaue Pünktchen, die scharf umgrenzt sind, diffus verteilt oder oft an der Peripherie der sonst orthochromatischen Erythrocyten liegend. Sie wird sowohl in Erythrocyten, Erythroblasten, Normoblasten, im zirkulierenden Blut und im Knochenmark gefunden; aber stets nur gemeinsam mit Polychromasie. Ist in bezug auf die vitale Netzstruktur und Polychromasie feststehend, daß sie plasmogener Herkunft sind und ihr Erscheinen auf eine normale, wenn auch gesteigerte regenerative Tätigkeit des Knochenmarks zurückzuführen ist, so ist in der Anschauung über die basophile Punktierung der Erythrocyten bei den Hämatologen nicht die gleiche Übereinstimmung zu treffen. Hier gibt es sowohl noch Vertreter der karyogenen als

auch plasmogenen Abkunft der basophilen Punktierung, obwohl in neuester Zeit der Streit zugunsten der protoplasmatischen, speziell spongioplasmatischen Abstammung mit Wahrscheinlichkeit entschieden ist. Vor allem war es PAPPENHEIM, der es versuchte, auf färberischem Wege zu beweisen, daß die Granula kein Chromatin, sondern plasmatischer Abkunft sind. Zu diesem Zwecke benutzte er zwei basische Farbstoffe (Methylgrün-Pyronin) und konnte zeigen, daß sich Kern und Kernfragmente mit der einen basophilen Komponente, die basophilen Granula und Polychromasie sich mit der anderen Komponente anfärbten. Auch SCHILLING vertritt die Ansicht, daß die basophile Punktierung aus dem Spongioplasma, vielleicht durch „tropfige Entmischung" hervorgehe. Demgegenüber nimmt P. SCHMIDT an, daß die basophile Substanz karyogener Abkunft ist. Nach seiner Meinung kommt es bei Bleivergiftung zu einer Bleidepotbildung im Knochenmark, von wo aus das Blei besonders auf die Kerne der roten Stammzellen wirkt, als ein direktes Zellkerngift. „Es handelt sich nach vorausgegangener Reizwirkung nur um eine Nekrobiose, wobei zunächst basophile Stoffe (die basophilen Körner) förmlich vom Kern sezerniert werden." Polychromasie erklärt P. SCHMIDT dann durch weitere Auflösung und diffuse Verteilung der Kernreste. Doch seine Anschauung ist wohl heute nicht mehr haltbar. Gegen die Entstehung der basophilen Granula durch Karyorhexis spricht auch ihr Vorkommen in Normoblasten mit vollkommen intaktem Kern und bei Tieren mit dauerkernigen Erythrocyten. In neuerer Zeit lieferten VOIT und ROESE wieder eine Stütze für die Anschauung, daß die basophile Substanz nicht vom Kern abstammen kann, mit Hilfe der Nuclealfärbung (= Reaktion der Thymonucleinsäure mit fuchsinschwefliger Säure nach FEULGEN). Mit dieser Färbung wird ein bestimmter Kernbestandteil, die Thymonucleinsäure, chemisch nachgewiesen. Die Forscher fanden, daß alle Kerne der Blutzellen diesen Bestandteil enthielten, daß aber Erythrocyten mit Substantia granulo-filamentosa, Polychromasie und basophiler Punktierung die Reaktion nicht geben. Heute ist wohl die von SCHILLING vertretene Ansicht, daß vitale Netzstruktur, Polychromasie und basophile Punktierung substantiell identisch sind und sich nur morphologisch unterscheiden, zur allgemein anerkannten Tatsache geworden. Allein in der Wertung und klinisch-diagnostischen Bedeutung der basophilen Punktierung herrschen Meinungsverschiedenheiten. SCHILLING vertritt die Anschauung, daß in der „basophilen Punktierung ein streng charakterisierter morphologisch und physiologisch veränderter Zustand" vorliege, daß sie eine „krankhafte Form der Regeneration" darstelle. Auch NAEGELI hält sie für den Ausdruck einer geschädigten Regeneration. Dagegen ist BRÜCKNER der Meinung, daß „das Verhältnis der Polychromasie zur Zahl der basophil punktierten Erythrocyten eine Funktion der Temperatur und des Feuchtigkeitsgehaltes der Atmosphäre

bzw. der Verdunstungsgeschwindigkeit des Wassers aus den Zellen" ist, und daß das Auftreten von basophiler Punktierung klinisch nichts Besonderes, „nichts spezifisch Krankhaftes" sei. Und zwar soll die Wasserverdunstung abhängig sein von dem biologischen Zustand der Erythrocyten, so daß diejenigen Roten, die ihr Wasser leicht abgeben, zu polychromatischen werden, während die, die ihr Wasser schlecht abgeben, infolge Pachydermie und Resistenzerhöhung zu basophil punktierten werden. Ein sicherer Beweis für eine dieser Anschauungen ist bis heute noch nicht erbracht, immerhin ist doch auffallend, daß die basophile Punktierung besonders reichlich bei Anämien mit toxischem Charakter, wie Malaria, Bleikrankheit, Wurmanämien, auftritt und daß in einem Präparat bei ein und derselben Behandlungsweise immer die basophilen Erythrocyten in der Zweiheit der Erscheinungsform auftreten und deshalb auch in der Klinik prognostisch und diagnostisch als von ausschlaggebender Bedeutung gewertet werden.

In dieser Arbeit wurde der Versuch gemacht, durch geeignete Untersuchungen etwas über die Urform der basophilen Substanz im lebenden Erythrocyten zu erfahren. Eigentlich müßte man ja dazu imstande sein, den Erythrocyten in seinem normalen Milieu, d. i. im zirkulierenden Blut, zu studieren. Denn im Augenblick, wo er aus der Blutbahn austritt, ist er schon anderen physikalischen und chemischen Bedingungen unterworfen, auf die er auch irgendwie reagiert. Um diese Fehlerquellen auf ein Minimum herabzudrücken, wurden Verfahren angewandt wie Dunkelfelduntersuchung und sofortige Fixation, die gestatten, den Zustand des Erythrocyten in dem eben ausgetretenen Blutstropfen zu beobachten.

Die Untersuchungen wurden an Meerschweinchen ausgeführt, denen Bleiacetat subcutan injiziert wurde, bis reichlich Polychromasie und basophile Punktierung im gewöhnlichen Ausstrich auftraten. Während der Dauer der Untersuchungen wurden die Tiere unter mäßiger Bleiwirkung gehalten. Die Ausstriche (Kontrollpräparate) wurden, wenn nicht besonders erwähnt, ca. 10 Minuten luftgetrocknet, hitzefixiert und anschließend mit Borax-Methylenblau nach MANSON gefärbt.

Osmiumfixierung.

Die feuchte Osmium-Dampffixierung des frischen, schnell bereiteten Präparates bietet gegenüber der Alkohol- oder Hitzefixation den Vorteil, daß die Erythrocyten nicht schrumpfen und deformiert werden, sondern in einer Form erhalten bleiben, wie sie der in vivo wohl am nächsten kommt. Die Fixierung wurde nach der von WEIDENREICH angegebenen Methode vorgenommen. Der Deckel und Boden einer Petrischale werden mit Fließpapier ausgelegt, auf das einige Kubikzentimeter einer 1%igen wäßrigen Osmiumsäurelösung aufgetropft

werden. Ein gut gereinigter Objektträger wird etliche Minuten in dieser feuchten Kammer gelassen, dann ein Tropfen frischen Blutes aus dem Ohr des Meerschweinchens darauf schnell ausgestrichen und der Objektträger für ca. 15 Sekunden in die Kammer zurückgebracht, so, daß die Ausstrichseite den Dämpfen direkt ausgesetzt ist. Daraufhin wird das Präparat einige Zeit an der Luft getrocknet und dann mit Borax-Methylenblau gefärbt.

Bei der mikroskopischen Betrachtung solcher Präparate zeigt sich nun folgendes: Die Erythrocyten sind größer als die des gewöhnlichen Ausstriches und wohlgestaltet. Das Kontrollpräparat (10 Minuten Lufttrocknung, Fixation) zeigt reichlich grobe und mittelgrobe basophile Punktierung und auch Polychromasie. Die basophile Substanz in den osmiumfixierten Präparaten zeigt andere Erscheinungsformen. Der ganze mit basophiler Substanz begabte Erythrocyt erscheint hier viel blauer als der normale. Bei genauer Betrachtung sieht man, daß er mit feinen, eventuell mittelfeinen Granula von gleichmäßiger Größe und Form ausgefüllt ist; das dazwischenliegende Protoplasma ist nicht, wie das in den Basophilpunktierten des Kontrollpräparates der Fall ist, orthochromatisch, sondern zeigt auch bläulichen Schimmer. Die Form der Granulation bei der Osmiumsäuredampffixierung ist eigentlich ein Mittelding zwischen Polychromasie und vitaler Netzstruktur. Es sind Erythrocyten vorhanden, die mehr der ersteren und andere, die mehr der letzteren ähneln. Der Einfachheit halber mögen sie unten in der Vergleichszählung als polychromatische angeführt werden. Auch typische basophile Punktierung, aber nur in der mittelgroben Art, war gelegentlich in den Präparaten zu finden, aber mehr an den dicken Stellen des Ausstriches und in weit geringerer Zahl als in den dazugehörigen Kontrollpräparaten.

Um einen zahlenmäßigen Überblick zu gewinnen und das Verhältnis der Basophilpunktierten zu den Polychromatischen zu bestimmen,

a) im Kontrollpräparat,

b) in Osmiumsäuredampffixation,

wurden Auszählungen an den Präparaten vorgenommen und der Durchschnittswert der basophilen Punktierung und Polychromasie bestimmt, die auf je 1000 Erythrocyten kommen. Die Werte wurden in folgender Weise gefunden: Es wurden je 5 Präparate derselben Blutentnahme ausgezählt; in jedem Ausstrich an vier Stellen ca. 10 Gesichtsfelder und aus den gefundenen Zahlen der Durchschnittswert auf 1000 Erythrocyten berechnet. Die Versuche wurden mehrmals wiederholt.

Ergebnis:

E. Z. = Erythrocyten; B. P. = basophile Punktierung; P. = Polychromasie.

	E.Z.	B.P.	P.
Kontrollpräparat	1000	50	32
Osmiumfixierung	1000	10	70

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Gesamtzahl der basophilen Erythrocyten bei den beiden Fixierungsarten nicht wesentlich differiert, dagegen die Erscheinungsformen sehr verschieden sind. Während bei der Osmiumfixierung die basophile Substanz hauptsächlich in feinen Körnchen diffus im Erythrocyten verteilt vorkommt, ist sie in dem Kontrollpräparat überwiegend in gröberen Körnern vorhanden. Warum erscheint nun ein und dieselbe Substanz einmal in dieser, einmal in jener Form? Die Erklärung dafür ist in der Annahme zu suchen, daß die basophile Substanz im zirkulierenden Blut kolloidal im Erythrocyten verteilt ist. Mit dem Austritt aus der Blutbahn kommt der Erythrocyt in andere Lebensbedingungen, es kommt zur Ausfällung der kolloidal verteilten basophilen Substanz, und je nachdem, ob der Prozeß schnell oder langsam vor sich geht, oder durch welche Art der angewandten Fixierungsmethode, bekommt man die Substanz in feinen oder gröberen Schollen im Plasma angeordnet.

Dunkelfelduntersuchungen.

Einen wesentlichen Aufschluß über die Urform der basophilen Substanz könnte ein positiver Dunkelfeldnachweis geben. Im fixierten und gefärbten Präparat ist Polychromasie und basophile Punktierung ohne weiteres als feine bzw. gröbere Körnelung zu erkennen. Anders verhält sich jedoch der Befund bei Dunkelfelduntersuchung eines frischen Bluttropfens. Die gewöhnlichen Erythrocyten erscheinen hier als dunkle Scheiben mit hell aufleuchtendem Rand, sonst sind sie optisch leer. Fangen sie an, auszutrocknen, so wird der Rand gezähnelt, die entstehenden Fibrinausscheidungen und -auflagerungen könnten leicht mit einer Struktur verwechselt werden. Neben den normalen Erythrocyten des frischen Präparates konnten nun immer etliche Blutkörperchen beobachtet werden, die durch ihre Größe, ihren etwas mehr grauen Schimmer und dadurch, daß sie nicht so schnell die Austrocknungsveränderungen zeigten, sich vor den übrigen auszeichneten. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um basophile Erythrocyten handeln könne, ein Beweis dafür war jedoch nicht zu erbringen. Eine Struktur war in dem lebenden Erythrocyten nicht zu erkennen, so daß man nach dem Dunkelfeldbefund annehmen müßte, daß im lebenden Erythrocyten die basophile Substanz äußerst fein und gleichmäßig dispergiert ist, und daß die bekannten Erscheinungsformen der basophilen Substanz, wie vitale Netzstruktur, Polychromasie und basophile Punktierung doch mehr oder minder Kunstprodukte sind, die bei der üblichen Behandlungsmethode der Präparate durch Ausfällung der basophilen Komponente des Erythrocytenplasmas entstehen. Es ist jedoch nicht zu vergessen, daß ein negativer Dunkelfeldnachweis nie beweisend sein kann dafür, ob eine Struktur vorhanden ist oder nicht.

Untersuchungen über die Form der basophilen Substanz bei verschieden langer Lufttrocknung.

Normalerweise wurden bei unseren Versuchen die Präparate ca. 10 Minuten bei Zimmertemperatur getrocknet, 4 Minuten in Alkohol fixiert und dann mit Borax-Methylenblau gefärbt. Brückner weist an Hand von Versuchen nach, daß die „Darstellbarkeit der basophilen Substanz und die Art ihrer Erscheinung in engem Zusammenhang mit der Intensität der Lufttrocknung vor der Alkoholfixierung steht".

Um den Einfluß der Lufttrocknung auf die Erscheinungsform der basophilen Substanz zu beobachten, wurden Präparate aus derselben Blutentnahme verschieden lange Zeit vor der Fixierung der Lufttrocknung ausgesetzt. Es wurden dann Auszählungen an verschiedenen Stellen und mehreren Präparaten vorgenommen und bestimmt, wieviel polychromatische und basophilpunktierte durchschnittlich auf 1000 Erythrocyten kommen; die Versuche wurden mehrmals wiederholt.

1. Der eben auf einen Objektträger ausgestrichene Blutstropfen wird sofort in Alkohol oder Hitze fixiert und dann gefärbt.

Befund: Alle Erythrocyten sind stark geschrumpft und deformiert; es sind reichlich homogen blaugefärbte basophile Erythrocyten zu erkennen, nur polychromatische und keine basophilpunktierten, obwohl das Kontrollpräparat reichlich basophile Punktierung zeigt. Bei dieser Methode kamen durchschnittlich auf

1000 E. Z. – 46 P.

2. Präparat 10 Sekunden luftgetrocknet und behandelt wie oben.

1000 E. Z. – 40 P. – 14 B. P.

3. 1 Minute luftgetrocknet.

1000 E. Z. – 40 P. – 20 B. P.

4. 4 Minuten luftgetrocknet.

1000 E. Z. – 25 P. – 35 B. P.

5. 10 Minuten luftgetrocknet.

1000 E. Z. – 22 P. – 40 B. P.

6. 2 Stunden luftgetrocknet.

1000 E. Z. – 25 P. – 40 B. P.

Bereits bei den Präparaten, die 4 Minuten luftgetrocknet wurden, sind die Erythrocyten von normaler Form und Größe. In Gegensatz zu den sofort fixierten Präparaten zeigen sie reichlich basophile Punktierung und schöne Polychromasie. Eine Lufttrocknung länger als 4 Minuten hat keinen wesentlichen Einfluß mehr auf das Verhältnis zwischen der Zahl der Polychromatischen und der Basophilpunktierten.

Es ist auffallend, daß bei den sofort fixierten Ausstrichen keine basophile Punktierung zu erkennen ist. Alle Erythrocyten sind durch

die plötzliche Wasserabgabe stark zusammengeschrumpft, und dasselbe Schicksal erleidet auch die nun auf einen kleineren Raum beschränkte basophile Substanz in ihnen. Durch die Wasserentziehung, sei es durch Hitze, Alkohol oder durch Einwirkung eines Farbstoffes wie bei der Vitalfärbung, wird die Zelle in ihrem normalen Gefüge gestört. Es ist vom Standpunkt der Chemie aus leicht vorstellbar, daß die kolloidal verteilte basophile Substanz ausgefällt wird; bleibt sie dann in feinen Körnchen, die eventuell noch untereinander in Verbindung stehen, im Erythrocyten verteilt, so sprechen wir von Polychromasie, ist sie mehr zusammengeballt und tropfig entmischt, so haben wir die basophile Punktierung vor uns. Es bestehen fließende Übergänge zwischen Polychromasie und basophiler Punktierung. Gewiß ist das Verhältnis zwischen beiden von der Intensität der Lufttrocknung bis zu einem gewissen Grade abhängig; aber es ist nicht ohne weiteres willkürlich zu erreichen, daß in einem Präparat nur Basophilpunktierte sind. Es kommen in unseren gewöhnlichen Präparaten immer beide Erscheinungsformen nebeneinander vor. Es kann nicht allein von den chemischen und physikalischen Einflüssen abhängen, ob wir bei unseren Methoden Basophilpunktierte oder Polychromatische bekommen. Da spielen noch andere Bedingungen mit, die wohl in der individuellen Eigenart eines jeden roten Blutkörperchens zu suchen sind. Ein geschädigter jugendlicher Erythrocyt, für einen solchen halten wir den basophilpunktierten, reagiert auf Austlockungsmethoden anders als der gesunde. Diese Überlegung veranlaßte dazu, einen Resistenzversuch anzustellen, um zu sehen, ob die basophilen Erythrocyten, besonders der basophilpunktierte, resistenter als der polychromatische und orthochromatische Erythrocyt ist.

Resistenzversuch mit nachträglicher Färbung.

Im allgemeinen beobachtet man bei Blutgiftanämien eine starke Resistenzänderung der Erythrocyten. Normalerweise beginnt die Hämolyse bei 0,55% Kochsalzlösung und ist hundertprozentig bei 0,3 bis 0,35% Kochsalzlösung. Dieses Verhalten der Erythrocyten hypotonischen Lösungen gegenüber ist von besonderem Interesse, denn es ermöglicht, die Erythrocyten ihrem chemisch-physikalischen Verhalten nach voneinander zu differenzieren. Dadurch kann man Einblicke in das Leben der Erythrocyten unter normalen und pathologischen Verhältnissen gewinnen. So stellten z. B. Morawitz und Pratt bei experimentell erzeugten Anämien mit Phenylhydrazin eine hochgradige Resistenzerhöhung fest; sogar im destillierten Wasser konnte manchmal keine vollständige Hämolyse erzielt werden. Als Erklärung für diese Tatsachen wurde von Itami und Pratt eine Vermehrung der Stromabestandteile angenommen, andere Forscher sprechen von Pachydermie. Im allgemeinen konnte festgestellt werden, daß die jungen Erythrocyten

eine höhere osmotische Resistenz besitzen als die älteren; aber auch unter den jungen gibt es hoch- und niederresistente. Die Untersuchungen wurden meistens an Retikulocyten gemacht, nachdem das Blut der fraktionierten Hämolyse ausgesetzt worden war, wurde die Zahl der Retikulocyten in der Zählkammer mit vitaler Färbung bestimmt.

Uns interessierte besonders die Frage, ob ein Unterschied in der osmotischen Resistenz zwischen Polychromasie und Basophilpunktierten vorhanden ist. Zu diesem Zwecke wurde das Blut des bleikranken Meerschweinchens der fraktionierten Hämolyse ausgesetzt. Begonnen wurde mit einer 0,8%igen Kochsalzlösung mit Abstufungen von je 0,02% bis zu einer Konzentration von 2,2% abwärts. Die Kochsalzlösungen wirkten ca. 5 Stunden auf die Erythrocyten ein, dann wurde zentrifugiert, aus dem Sediment Ausstriche angefertigt und schließlich diese in üblicher Weise luftgetrocknet, alkoholfixiert und mit Manson-Borax gefärbt.

Befund: Bei 0,8% Kochsalzlösung waren die Erythrocyten durchschnittlich wenig gequollen und polychromatische sowie basophilpunktierte waren reichlich vorhanden.

Bei ca. 0,6% NaCl-Lösung sind die Basophilpunktierten nur noch vereinzelt zu finden; die Polychromatischen sind relativ vermehrt.

Bei 0,48% NaCl-Lösung ist kein Basophilpunktierter mehr zu finden, Polychromasie ist reichlich.

Bis herab zu 0,22% NaCl Lösung sind die Polychromatischen weiter relativ vermehrt, aber basophile Punktierung ist nicht mehr nachzuweisen.

Daraus ist also zu schließen, daß die Polychromatischen resistenter sind, die Basophilpunktierten dagegen junge Erythrocyten mit verminderter Resistenzfähigkeit sind.

Blut längere Zeit stehenlassen.

Daß Polychromasie durch geeignete Methoden in extravasiertem Blut in basophile Punktierung übergeführt werden kann, bewies Schilling, und er begründete darauf die substantielle Identität der basophilen Substanz in Polychromatischen und Basophilpunktierten. Es wäre denkbar, daß auch im Körper selbst Polychromatische zu Basophilpunktierten werden, oder, was mir noch wahrscheinlicher erscheint, beide gehen aus einer gemeinsamen Urform, d. h. aus einem Erythrocyten, der die basophile Substanz kolloidal verteilt enthält, hervor. Um die Veränderungsmöglichkeiten der basophilen Substanz zu beobachten, wurde Blut, das reichlich basophile Punktierung und Polychromasie enthielt, unter sterilen Kautelen längere Zeit aufbewahrt in Zimmertemperatur und in gewissen Zeitabständen die Erscheinungsform der basophilen Substanz durch Anfertigung von Ausstrichpräparaten kon-

trolliert. Es zeigt sich, daß nach einer Stunde noch keine wesentliche Autolyse eingetreten ist, der Ausstrich zeigt Polychromasie und feine, mittelgrobe und sehr wenig grobe basophile Punktierung. Je länger aber das Blut nun steht, um so gröber wird die Punktierung, die basophile Substanz lagert sich zu groben Schollen zusammen, oft nur 2–5 Körner in einem Erythrocyten. So sind nach 32 Stunden die gewöhnlichen Erythrocyten schon massenhaft zugrunde gegangen und sehen sehr unscheinbar aus. Aber unter ihnen fallen Basophile mit grober Punktierung, die sehr gut erhalten sind, auf.

Gleichzeitig wurden Objektträger mit einem Tropfen Blut längere Zeit in der feuchten Kammer aufbewahrt. Auch bei diesem Versuch ist festzustellen, daß, je länger das Präparat in der feuchten Kammer aufbewahrt wurde, um so spärlicher wurde die Polychromasie und um so gröber die basophile Punktierung.

Die Tatsache, daß, wie durch die beiden Versuche erwiesen, die basophile Punktierung bei länger aufbewahrtem Blut gröber wird, und daß auch Polychromasie in basophile Punktierung überzugehen scheint, berechtigt zu der Annahme, daß es sich hier um verschiedene Grade der Ausfällung handelt. Je geschädigter ein basophiler Erythrocyt ist, was ja bei zunehmender Autolyse der Fall ist, um so mehr zeigt er die Neigung, zu einem Basophilpunktierten zu werden; er spricht eben auf die einwirkenden Faktoren anders an als ein eben aus der Blutbahn ausgetretener widerstandsfähiger polychromatischer Erythrocyt.

Knochenmarkstudien.

Von den bleikranken Meerschweinchen wurden auch Knochenmarkuntersuchungen angestellt, um die Form der basophilen Substanz in den Normoblasten und Erythroblasten zu beobachten. Knochenmarktupfpräparate, die ca. 10 Minuten luftgetrocknet und dann fixiert und mit Methylenblau oder Giemsa gefärbt sind, zeigen in der Hauptsache polychromatische Normo- und Erythroblasten, nur vereinzelt war basophile Punktierung zu erkennen, die auch zahlenmäßig nicht durch verschieden lange Lufttrocknung oder sofortige Fixation beeinflußt werden konnte.

Wir haben gesehen, daß die basophile Substanz in ihrer Erscheinungsform zu modifizieren ist: bei Vitalfärbung erscheint sie als vitale oder zerrissene Netzstruktur, im gewöhnlichen Ausstrichpräparat als Polychromasie und basophile Punktierung, bei Osmiumsäuredampffixierung als feinste Granulation, bei schnellem Wasserverlust vorwiegend als Polychromasie, bei langsamerem mehr als basophile Punktierung. Stellt man sich vor, daß sie im kreisenden basophilen Erythrocyten dispergiert ist, so ist doch anzunehmen, daß bereits jeder Erythrocyt schon im zirkulierenden Blut prädestiniert ist, im gewöhnlichen

Ausstrich ein polychromatischer bzw. basophilpunktierter zu werden; der geschädigte wird zum basophilpunktierten. Wo diese toxische Schädigung wirkt und angreift, das ist bis heute noch nicht geklärt. So nehmen manche Autoren an, daß das Gift exogen wirkt, d. h. es greift die jungen Erythrocyten im zirkulierenden Blut oder auch im Knochenmark bereits an. M. Cohn und Askanazy vertreten die Ansicht, daß die basophile Körnelung von einer chemischen oder physikalischen Änderung des Blutplasmas (Gaswechsel, Hydrämie, Veränderung des Salzgehaltes) abhängt und nicht bereits im Knochenmark vorhanden ist, sondern erst im kreisenden Blut auftritt, wo der Erythrocyt der Einwirkung des Plasmas ausgesetzt ist. Friedländer spricht von einer „basophilic degeneration" und nimmt an, daß die Retikulocyten durch die toxische Substanz, Blei in diesem Falle, derart angegriffen worden sind, daß die Granula viel gröber geworden sind als in den vitalgefärbten Retikulocyten, so daß sie nun auch bei gewöhnlicher Färbung, ohne daß vital vorgefärbt werden müßte, gesehen werden können. Auch Grawitz nimmt ja eine toxische Wirkung vom Blutplasma ausgehend an; so fand er basophile Punktierung bei allen Anämien mit toxischem Einschlag, dagegen keine, wo eine giftige Wirkung nicht vorhanden war, wie z. B. bei Chlorose.

Ich machte den Versuch, polychromatisches Blut in vitro der Bleiacetatlösung auszusetzen. Benutzt wurde dazu das Blut eines durch dauernde Blutentnahme anämisch gemachten Meerschweinchens. Die Ausstrichpräparate von diesem Blut zeigten massenhaft Polychromatische und nur ganz vereinzelt hin und wieder einen mittelgroben Basophilpunktierten. Das polychromatische Blut wurde steril längere Zeit aufbewahrt mit Zusatz einer 1%igen bzw. 4%igen Bleiacetatlösung. In Abständen von 15 Minuten werden Ausstriche angefertigt. Dabei zeigt es sich, daß das Blei in vitro keinerlei Veränderungen in der Erscheinungsform der basophilen Substanz hervorruft. Das mit Blei behandelte Blut unterschied sich in keiner Weise von dem unter denselben Bedingungen, aber ohne Bleizusatz aufbewahrten Blut.

Nähme man an, daß die basophilen Erythrocyten erst in der Blutbahn geschädigt werden, so daß sie dann als Basophilpunktierte im Ausstrich oder als zerrissene Netzsubstanz im dicken Tropfen sich darstellen, so müßte ein viel größerer Parallelismus zwischen Schwere der Vergiftung und Zahl der Basophilpunktierten bestehen. Das ist aber nicht der Fall. So schwinden z. B. die Basophilpunktierten vor dem Tode. Vielmehr gehen Zahl der Basophilpunktierten und Stärke der Regeneration parallel. Das veranlaßte auch Naegeli, anzunehmen, daß beim Erscheinen der basophilen Punktierung ein Organ seine Hand im Spiele habe: das Knochenmark. Die basophilpunktierten Erythrocyten werden bereits bei ihrer Bildung im Knochenmark geschädigt, und somit ist die Ursache für die Entstehung der Punktierung anlagemäßig im

Erythrocyten begründet, maßgebend dafür ist ein endogener Faktor, die veränderten biologischen Eigenschaften des roten Blutkörperchens.

Daß die basophile Substanz im gewöhnlichen Lufttrockenpräparat einmal als Polychromasie, einmal als basophile Punktierung erscheint, liegt darin begründet, daß der basophilpunktierte jugendliche Rote geschädigt ist und infolgedessen seine basophile Substanz viel stärker den ausfällenden Faktoren preisgegeben ist, so daß es zu einer „tropfigen Entmischung" kommt.

Die Vorstellungen von der Anordnung der basophilen Substanz im Erythrocyten hängen eng zusammen mit der Anschauung über Protoplasmastrukturen überhaupt. Nach Schilling besteht das Protoplasma

a) aus radiär angeordnetem Stroma mit Hämoglobin dazwischen,

b) in jugendlichem Zustand aus darauf aufgereihten basophilen Substanzen, die als Polychromasie, modifiziert als Netzstruktur und pathologisch als basophile Punktierung erscheinen können.

Und zwar entspricht die basophile Substanz der Erythrocyten (nach Schilling und Pappenheim) dem Spongioplastin der übrigen somatischen Zellen. Neben diesem Spongioplasma besitzt der Erythrocyt noch die oxyphile Substanz, das Paraplasma. Bei jungen Erythrocyten ist das Spongioplasma stark ausgeprägt; wird der Erythrocyt älter, so schwindet es lytisch, ist aber wohl auch noch im vollständig reifen Erythrocyten vorhanden, aber mit den gewöhnlichen Methoden nicht darstellbar. Dieser Entwicklung ganz entsprechende Vorgänge spielen sich z. B. auch an den Epithelien der Haut ab. Was diese basophile Protoplasmasubstanz chemisch darstellt, ist bis heute noch nicht endgültig bewiesen. Pappenheim rechnete sie zu den Lipoiden, andere Autoren nehmen eine eiweißartige Beschaffenheit an. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die basophile Substanz ein kolloidaler Stoff ist und als solcher auch den Gesetzen der Kolloidchemie unterworfen ist, d. h. durch Ladungsänderung ausgefällt, denaturiert, koaguliert wird, sei es durch Hitze, Alkohol oder irgendeine andere Substanz. – So ist zusammenfassend zu sagen, daß als die Urform der basophilen Substanz in dem Erythrocyten sowohl im zirkulierenden Blut als auch in den Blutbildungsstätten die kolloidale Verteilung im Erythrocyten anzusehen ist, gleichgültig, ob bei unseren Darstellungsmethoden später die basophile Substanz als vitale Netzstruktur, Polychromasie oder basophile Punktierung auftritt.

Literatur.

Askanazy, Z. klin. Med. **23** (1893); **64** (1907).
Behrendt, Dtsch. med. Wschr. **1899**. V. B. Nr. 42 u. 44.
Blumenthal, Fol. haemat. (Lpz.) **7**, 313.
Brückner u. Spatz, Arch. f. Hyg. **97** (1926) 277.
Brückner, Arch. f. Hyg. **98** (1927) 95; **99** (1928) 236.

M. Cohn, Münch. med. Wschr. **1900**. Nr. 6.
Cohn, Klin. Wschr. **1926**, 1079; **1927**, 50.
Cooke, Fol. haemat. (Lpz.) **38** (1929) 194.
Dietrich, Fol. haemat. (Lpz.) Arch. **9**, 297.
Ehrlich, Charité-Ann. **10** (1885).
Ferrata, Fol. haemat. (Lpz.) **9**, 95.
Friedländer, Arch. int. Med. **44** (1929).
Grawitz, Dtsch. med. Wschr. **1899**. Nr. 36; **1901**. Nr. 52; **1905**. Nr. 19.
Hertz, Fol. haemat. (Lpz.) Arch. **9**, 294.
Istmanowa, Z. exper. Med. **52** (1926) 140.
Kleeberg, Münch. med. Wschr. **1927**, 805.
Koenig, Fol. haemat. (Lpz.) Arch. **9**, 278.
Leblanc, Fol. haemat. (Lpz.) **27** (1922) 149.
Mavros, Z. klin. Med. **110** (1929) 444.
Naegeli, Lehrbuch d. Blutdiagnostik.
Pappenheim, Fol. haemat. (Lpz.) **7**, 11.
Plehn, Dtsch. med. Wschr. **1899**. Nr. 28.
Rosin-Biebergeil, Virchows Arch. **58** (1904).
Seyfarth, Virchows Arch. **266** (1928) 676. – Fol. haemat. (Lpz.) **34** (1927) 7.
v. Schilling, Fol. haemat. (Lpz.) Arch. **11**, 327; **14**, 194. – Virchows Arch. **1921**, 234, 548.
P. Schmidt, Zbl. Gewerbehyg. **1**. Nr. 1, 9–10; Nr. 2, 21–25.
Schultz-Charlton, Münch. med. Wschr. **1916**, 631.
Simmel, Fol. haemat. (Lpz.) **32** (1926) 97.
Swotskaja, Z. exper. Med. **5** (1923).
Voit u. Roese, Z. exper. Med. **47** (1927).

Printed in Germany

Lebenslauf

Am 3. März 1908 wurde ich, Hilde Daum, als Tochter des Rektors Georg Wilhelm Daum und seiner Ehefrau Barbara geb. Messerschmidt in Alzey, Rheinhessen, geboren. Von 1914–1924 besuchte ich das Lyzeum, von 1924–1927 die Oberrealschule zu Alzey, woselbst ich auch die Reifeprüfung ablegte. In meinen vorklinischen Semestern studierte ich an den Universitäten Zürich, Kiel, München, bestand 1930 in München das Physikum, studierte dann in Wien und Berlin und bestand 1933 in Berlin das medizinische Staatsexamen. In meinem praktischen Jahr war ich am Rudolf-Virchow-Krankenhaus in Berlin tätig. Augenblicklich bin ich Volontärassistentin an der Universitäts-Kinderklinik zu Leipzig.